

QUALITÀ E AUTENTICITÀ DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

Memoria dell'Accademico

VITTORIO M. MORETTI*

in collaborazione con

FEDERICA BELLAGAMBA**,

MARIA LETIZIA BUSETTO***,

FABIO CAPRINO****

Assemblea del 17 novembre 2006

RIASSUNTO:

La sicurezza, la qualità e l'autenticità rappresentano aspetti diversi nella valutazione di un alimento di origine animale. La sicurezza di un alimento non necessariamente implica qualità, così come l'autenticità non sempre è garanzia di qualità o di salubrità di un prodotto. La necessità di autenticare analiticamente un prodotto alimentare nasce molti anni or sono per limitare le frodi, le sofisticazioni e le contraffazioni. Con l'apertura dei mercati internazionali - globalizzazione - tale esigenza si è ulteriormente ampliata, coinvolgendo fattori relativi agli ingredienti o componenti degli alimenti, ma è anche diventata prioritaria per valorizzare gli alimenti, legarli al territorio di produzione e difenderli dalla crescente invasione di prodotti massificati ed indistinguibili. Il primo problema da affrontare riguarda l'identificazione della specie d'origine, soprattutto in presenza di un prodotto lavorato o trasformato. Gli esempi sono molteplici: dalla carne in scatola al tonno sott'olio, alle mozzarelle e formaggi prodotti con latte di specie diverse, ai prodotti semilavorati che hanno perso la loro peculiare identità morfologica (es. filetti di pesce). Accanto all'identificazione di specie, i metodi di lavorazione, i legami con il territorio e l'origine geografica rappresentano altri importanti aspetti in grado di produrre informazioni preziose nella valutazione dell'autenticità delle produzioni animali.

SUMMARY: *Quality and authenticity of food of animal origin.*

Food safety, quality and authenticity are different aspects when evaluating food of animal origin. Consequently, different questions concerning this evaluation have arisen, and different answers need to be given. Actually, food safety does not guarantee food quality, and also

* Professore Straordinario di Zootechnica Speciale, Università degli Studi di Milano; e-mail: vittorio.moretti@unimi.it

** Assegnista di Ricerca, Università degli Studi di Milano; e-mail: federica.bellagamba@unimi.it

*** Borsista della Scuola di Specializzazione in Allevamento, Igiene, Patologie delle Specie Acquatiche e Controllo dei prodotti derivati, Università degli Studi di Milano; e-mail: maria.busetto@unimi.it

**** Assegnista di Ricerca, Università degli Studi di Milano; e-mail: caprino.fabio@unimi.it

food authenticity does not assure quality and hygienic properties of animal products. For many years food authentication by means of objective analytical procedures became a priority, especially in those sectors where fraudulent procedures together with adulteration and faking are quite spread. Because of the opening of international trade (globalization) the value of this authentication increased, involving both food ingredients and composition. It became a priority approach, aiming to enhance and defend the quality of products, that are characterized by a strong link with the area of production, compared to standardized and undistinguishable food. Different and related approaches must be considered to guarantee consumers at each level. The first question concerns the identification of species, mainly of manufactured and derived products. Several examples might be described: cured meat, canned tuna, mozzarella and typical cheeses, that are produced by specific milk, and moreover manufactured derivatives that lost their morphological identity (i.e. fish fillets). Together with species identification, production methodology and geographical origin are important aspects aiming to evaluate authenticity of food with animal origin.

RÉSUMÉ: *Qualité et authenticité des aliments d'origine animale*

La sécurité alimentaire, la qualité et l'authenticité représentent différents aspects dans l'évaluation d'un aliment d'origine animale et ont suscité diverses problématiques auxquelles il a fallu fournir différentes réponses. En effet, la sécurité d'un aliment ne signifie pas nécessairement qualité, de même que l'authenticité n'est pas toujours une marque de qualité ou la garantie d'hygiène d'un produit. Voici bien des années que s'est manifesté le besoin d'authentifier de façon analytique un produit alimentaire, surtout dans les secteurs viticole et des huiles, afin de résoudre les problèmes de fraude, de sophistication et de contrefaçon. Avec l'ouverture des marchés internationaux –la globalisation– cette exigence est devenue plus pressante puisque sont également impliqués d'autres facteurs liés aux ingrédients ou aux composants des aliments, mais elle est devenue prioritaire pour valoriser les aliments, rattachés au terroir de production, et les défendre face à la croissante invasion de produits massifiés et indéfinis. Il faut donc considérer de multiples aspects liés entre eux, qui fournissent à différents niveaux une garantie pour le consommateur. Le premier problème qu'il faut affronter concerne l'identification de l'espèce d'origine d'autant plus lorsqu'on se trouve confronté à un produit travaillé ou transformé. Les multiples exemples vont de la viande en boîte au thon à l'huile, aux «mozzarella» et aux fromages produits avec du lait de différents espèces, aux produits semi finis qui ont perdu leur spécificité morphologique (par exemple les filets de poissons). L'identification des espèces, les méthodes de production, les liens avec le terroir et l'origine géographique sont des aspects importants capables de nous fournir des informations précieuses pour l'évaluation de l'authenticité dans la production animale.

1 - INTRODUZIONE

L'adozione in Europa di severe misure precauzionali rivolte al controllo dei mercati internazionali, alla definizione di procedure di tracciabilità e rintracciabilità lungo tutta la filiera alimentare, di disciplinari per la tutela di prodotti che abbiano acquisito denominazioni di origine, palesa la volontà di tutelare il consumatore non solo in termini di sicurezza alimentare, ma anche di qualità dei prodotti, valutata nei suoi diversi aspetti. Peraltro, la sicurezza alimentare, la qualità e l'autenticità dei prodotti rappresentano aspetti diversi nella valutazione di un alimento di origine animale, che quindi hanno suscitato problematiche diverse, a cui è stato necessario fornire risposte diverse. Infatti, la sicurezza di un alimento non necessariamente significa qualità, così come l'autenticità non sempre è garanzia di qualità o garanzia igienico-sanitaria di un prodotto.

I criteri di tracciabilità stabiliti per i diversi prodotti alimentari, di origine animale e non, si basano essenzialmente sull'archiviazione di una serie di informazioni attraverso sistemi oggi perlopiù elettronici e informatizzati, allo scopo di seguire l'*iter* del prodotto lungo tutta la filiera, che comprende le fasi fondamentali di produzione, trasformazione e distribuzione. Produrre la tracciabilità di un alimento ha lo scopo fondamentale di garantire il percorso a ritroso rispetto a quello che lo ha portato sulla tavola del consumatore, cioè la sua rintracciabilità, ed è particolarmente utile in caso di allerte sanitarie. In alcuni casi i sistemi di tracciabilità dei prodotti si sono rivelati deboli ed imprecisi, facendo emergere la necessità di fornire metodologie analitiche sempre più accurate per arrivare alla vera identità del prodotto. La rintracciabilità dei prodotti a base di carne che utilizza tecniche del DNA, basandosi sulla variabilità genetica del singolo individuo (*genetic fingerprints*), è un chiaro esempio di come una metodologia analitica complessa sia diventata uno strumento non solo in grado di garantire un oggettivo sistema di tracciabilità/rintracciabilità nel settore delle carni bovine, ma anche di come abbia potuto avere un'applicazione pratica valida e sempre più diffusa.

La necessità di autenticare analiticamente un prodotto alimentare nasce molti anni or sono, soprattutto nel settore dei vini e degli oli, inizialmente per risolvere problemi relativi alle frodi (usare il nome di un vino famoso per un prodotto di minor pregio), all'introduzione in un alimento di sostanze estranee alla sua composizione (sostituzioni) o alla sostituzione di una sua componente con un'altra di minore valore (contraffazioni). Con l'apertura dei mercati internazionali - globalizzazione - tale esigenza si è ulteriormente ampliata ed ha coinvolto anche fattori relativi non solo agli ingredienti o componenti degli alimenti, ma anche e soprattutto fattori esterni, o estrinseci, primi tra tutti i fattori relativi ai territori di produzione. Ha preso quindi corpo la necessità di dare risposte non solo sulle caratteristiche intrinseche del prodotto, ma anche sulla sua origine geografica. Valgano per tutti gli esempi dei pomodori cinesi, o delle olive provenienti dalla Spagna, o dei crostacei provenienti dall'Ecuador, dalla Thailandia e dall'Iran, e tutto ciò indipendentemente da considerazioni di tipo sanitario, indubbiamente da valutare, e per motivi semplicemente e prettamente merceologici. Se pensiamo per esempio alle specie ittiche, vediamo che già le norme (Regolamento CE n. 2065/2001, recepito dal Decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali del 27/03/2002) prevedono di fornire accanto alla denominazione della specie, anche il luogo di cattura, nonché la dichiarazione se si tratta di un pesce allevato o pescato.

Sono quindi da considerare molteplici fattori tra loro correlati, che forniscono garanzia al consumatore a livelli differenti. Il primo problema da affrontare riguarda l'identificazione di specie, soprattutto quando ci si trova di fronte ad un prodotto lavorato o trasformato. Gli esempi in questo senso possono essere molteplici e vanno dalla carne in scatola, al tonno sott'olio, alle mozzarelle e formaggi prodotti con latte di specie diverse, ai prodotti se-

milavorati che hanno perso la loro peculiare identità morfologica (es. filetti di pesce). Accanto all'identificazione di specie, l'origine geografica e i metodi di produzione rappresentano altri importanti aspetti in grado di produrre informazioni preziose nella valutazione dell'autenticità delle produzioni animali (Moretti *et al.*, 2003).

2 - L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

I risvolti legati all'identificazione di specie hanno riguardato non solo questioni etiche e religiose, come per esempio la rinuncia dei mussulmani a consumare carne suina o di altre comunità quella di cavallo, ma anche questioni legate alla salute del consumatore; si pensi per esempio a soggetti che possono essere allergici a particolari proteine del latte di alcune specie. In situazioni particolari, come quella dell'emergenza sanitaria a causa della BSE, l'identificazione di specie delle farine proteiche usate nell'alimentazione degli animali allevati è diventato poi un problema di salute pubblica.

Le questioni analitiche relative all'identificazione di specie hanno rivelato non pochi problemi legati alla trasformazione e lavorazione dei prodotti che causava non solo la perdita delle originarie caratteristiche fisiche del prodotto, ma anche alla modificazione chimica e biochimica dei principali nutrienti.

I tradizionali metodi applicati per l'identificazione di specie si sono sempre basati sulla caratterizzazione delle proteine specie-specifiche. Le metodologie applicate per l'identificazione proteica sono state perlopiù tecniche elettroforetiche, quali l'iso-elettro focalizzazione (IEF), l'elettroforesi capillare (CE) (Janssen *et al.*, 1990; Zerifi *et al.*, 1991). Anche le tecniche immunologiche (test immuno-enzimatici tipo ELISA, immunodiffusione in gel di agar) per il riconoscimento delle proteine specie-specifiche hanno avuto, prima della diffusione delle tecniche di biologia molecolare, diverse applicazioni (Rehbein, 1990; Martin *et al.*, 1991; Cutrufelli *et al.*, 1993; Sotelo *et al.*, 1993; Ansfield *et al.*, 2000). Il drastico trattamento termico a cui vengono sottoposti alcuni prodotti durante la loro preparazione, ha come conseguenza la denaturazione della struttura delle proteine, della loro attività biologica e delle proprietà chimiche. Per questi prodotti quindi risulta molto complessa l'applicazione delle tecniche elettroforetiche o immunochimiche senza incorrere in problemi di cross-reattività o in un abbassamento significativo della sensibilità.

Attraverso tecniche di biologia molecolare e, in particolare, mediante la PCR, è stato possibile amplificare frammenti di DNA ritenuti informativi. Queste tecniche consentono il riconoscimento e la rintracciabilità di: specie vegetali (es. presenza di soia in prodotti dichiarati di carne), l'identificazione e la quantificazione di organismi geneticamente modificati; specie animali, tra cui le specie ittiche in matrici biologiche complesse; linee cellulari; specie batteriche.

Il principio su cui si basano tali tecniche consiste nel riconoscimento di sequenze specie-specifiche presenti negli acidi nucleici (DNA mitocondriale,

DNA satellite).

Il DNA satellite contiene sequenze nucleotidiche specie-specifiche non codificanti, conservate e altamente ripetute, situate per lo più nella zona centromerica dei cromosomi, costituendo negli eucarioti il 5-20 % del genoma. L'identificazione di tali sequenze può avvenire sostanzialmente impiegando due tecniche:

- l'amplificazione mediante PCR di queste regioni con l'impiego di *primers* specifici (Matsunaga *et al.*, 1999; Lahiff *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2003);

- l'ibridazione su membrana (*slot/dot blot*) di tali sequenze specie-specifiche con oligonucleotidi complementari marcati con radionuclidi o altri sistemi non radioattivi (Buntjer *et al.*, 1995; Jobse *et al.*, 1995; Janssen *et al.*, 1998; Buntjer *et al.*, 1999).

Le proprietà del DNA mitocondriale conferiscono ottime caratteristiche per un suo impiego come *target* nell'identificazione di specie quali i mammiferi, gli uccelli ed i pesci. Infatti, il DNA mitocondriale oltre ad avere un'eccellente resistenza al trattamento termico ed essere presente in molteplici copie all'interno di una cellula, è un *target* ideale per gli studi di filogenesi, in quanto ha una velocità di evoluzione molto più elevata del DNA nucleare, permette di avere una diversità nelle sequenze maggiore, facilitando l'identificazione di specie (Kocher *et al.*, 1989).

Il DNA mitocondriale (mtDNA) è stato studiato (Irwin *et al.*, 1991) per individuare le relazioni filogenetiche e l'evoluzione molecolare tra gli individui, popolazioni e specie. L'impiego di *primers* universali (Kocher *et al.*, 1989; Barlett, Davidson, 1992), cioè in grado di ibridare regioni conservate nei vertebrati, appartenenti al gene mitocondriale del citocromo b, ha reso possibile amplificare una regione (359 bp), il cui sequenziamento ha messo in evidenza una variabilità genetica inter- e intraspecifica, nei mammiferi, negli uccelli e nei pesci. L'identificazione della variabilità specie-specifica all'interno del frammento amplificato mediante sequenziamento diretto o digestione con endonucleasi (PCR-RFLP) ha reso possibile differenziare non solo specie molto differenti, come mammiferi, uccelli e pesci, ma anche specie filogeneticamente più correlate, come suino e cinghiale, bovino e bufalo, cavallo ed asino (Meyer *et al.*, 1995; Rehbein *et al.*, 1997; Quinterio *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1999; Asensio *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 2000; Bellagamba *et al.*, 2001; Sebastio *et al.*, 2001; Rehbein *et al.*, 2002). Sequenze di DNA specie-specifiche sono state individuate ed utilizzate nel riconoscimento di specie sempre in sequenze di DNA genomico appartenenti a geni codificanti per le unità ribosomiali 12S e 5S (Carrera *et al.*, 2000; Bellagamba *et al.*, 2003).

Sebbene le tecniche basate sulla PCR tradizionale abbiano prodotto risultati incoraggianti anche nel riconoscimento di una certa specie in matrici alimentari complesse, tuttavia non producevano un risultato quantitativo, richiesto in molte situazioni. La reazione di PCR, infatti, non ha un andamento costantemente esponenziale e la quantità di prodotto di PCR che si ottiene

dopo 30-40 cicli non è proporzionale al numero di copie di DNA presenti (DNA templatato) nel campione analizzato.

I geni presenti in singola copia sono stati studiati per la messa a punto di sistemi di PCR quantitativa (*RealTime-PCR*). La RT-PCR consente di monitorare ciclo dopo ciclo la produzione degli ampliconi attraverso un sistema di marcatura dello stesso amplicone che invia un segnale a un *detector* che in questo modo registra l'avvenuta reazione, cioè la formazione di una nuova "copia" di DNA *target*. La PCR quantitativa sfrutta così la fase iniziale della reazione, cioè quella esponenziale, quando vi è una relazione lineare tra il DNA templatato e una copia del frammento amplificato.

La sensibilità della PCR quantitativa rispetto ad una normale PCR è molto più elevata e per questo tale metodica ha avuto particolare successo nella ricerca di OGM ed anche nella caratterizzazione delle farine proteiche, o comunque nel risolvere problemi di rintracciabilità di elementi presenti in quantità relativa bassa (Lahiff *et al.*, 2002; Brodman *et al.*, 2003; Mendoza-Romero *et al.*, 2004; Krčmář, Renčová, 2005). L'elevata sensibilità di questa metodica di PCR è legata al fatto che in questo caso diventa possibili scegliere come frammenti target sequenze di DNA molto corte anche inferiori alle 100 paia di basi.

3 - L'INDIVIDUAZIONE DEL METODO DI PRODUZIONE

La determinazione del metodo di produzione di un alimento di origine animale, ove per metodo di produzione s'intendono tutti gli aspetti legati alle tecnologie di allevamento ed alla gestione (*management*) aziendale, comporta, anche e soprattutto dal punto di vista analitico, la valutazione di una serie di problematiche piuttosto complesse. In generale, è la dieta degli animali, cioè la tipologia dell'alimento somministrato, quella che più influenza le caratteristiche del prodotto, ed è quindi lì che si restringe il campo d'indagine. Nel comparto lattiero-caseario per esempio sono ben note le differenze in termini composizionali, soprattutto nei grassi, tra latte prodotto da vacche al pascolo, rispetto a quello di vacche alimentate con mangime concentrato. La componente lipidica nel latte dei ruminanti è fortemente influenzata dai processi metabolici che avvengono nel rumine, ove l'attività di idrogenazione dei doppi legami operata dalla microflora batterica comporta la comparsa di acidi grassi *trans*, primo fra tutti l'acido vaccenico (18:1 n-7*trans*), e gli isomeri dell'acido linoleico (CLA). Questi acidi grassi sono quasi esclusivi dei ruminanti (se si escludono i processi di idrogenazione degli oli vegetali per la produzione delle margarine) e sono degli ottimi marcatori dei "processi di produzione".

Nel settore ittico è molto attuale il problema del riconoscimento dei pesci pescati rispetto a quelli allevati (Aursand *et al.*, 2000). Anche in questo caso il mangime artificiale, con i suoi contenuti in farine ed oli di pesce e farine ed oli vegetali, ci guida nello studio e nell'individuazione della differenze. In generale, i pesci allevati sono tendenzialmente più grassi dei pesci pescati, della stessa

specie ovviamente, e negli allevati i lipidi contengono un maggior contenuto in acido linoleico (18:2 n-6), tipico degli oli di cereali e scarsamente presente nelle catene trofiche acquatiche, specialmente in quelle marine (Serot *et al.*, 1998; Torstensen *et al.*, 2001; Turchini *et al.*, 2003).

4 - LEGAMI CON IL TERRITORIO ED ORIGINE GEOGRAFICA

Sicuramente la sfida più complessa è quella connessa con la determinazione analitica dell'origine geografica di un alimento, che include anche la capacità di potere rispondere alle domande sull'origine degli ingredienti e delle materie prime con cui è fatto. È questa il problema che più frequentemente viene posto all'attenzione del nostro laboratorio dagli operatori dei Posti di Ispezione Frontaliera, qualora si tratti di verificare il rispetto delle norme nei commerci internazionali di alimenti. In questi casi le tecniche analitiche che più si sono rivelate promettenti sono quelle che utilizzano la spettrometria di massa isotopica, che misura i rapporti isotopici degli elementi che compongono i nostri alimenti (Rossman, 2001). L'attenzione è rivolta soprattutto ai rapporti isotopici degli elementi leggeri coinvolti nei processi biosintetici, quali il carbonio, l'idrogeno, l'azoto, l'ossigeno. Il rapporto isotopico del carbonio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in un animale dipende prevalentemente dalla tipologia di alimento assunta: per esempio nei ruminanti una dieta costituita da erba e fieno, ossia substrati di piante a ciclo fotosintetico C3, tende a fare diminuire il contenuto in ^{13}C nei tessuti. Maggiore è l'apporto alla dieta di piante a ciclo fotosintetico C4, come il mais, più il $\delta^{13}\text{C}$ nei tessuti animali aumenta. Formaggi o carni relativi ad una situazione di pascolo e quindi ad una dieta meno integrata dai mangimi, sono caratterizzati da valori di $\delta^{13}\text{C}$ inferiori rispetto a quelli prodotti intensivamente (Schmidt *et al.*, 2005).

Il tenore in $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ può essere correlato alle condizioni pedologiche e geoclimatiche - caratteristiche del suolo, altitudine, umidità - del luogo di provenienza degli alimenti destinati agli animali e alle pratiche di fertilizzazione adottate. È stato sperimentato che un aumento dei processi di nitrificazione del suolo comporta un abbassamento del contenuto in ^{15}N . L'adozione inoltre di pratiche estensive di fertilizzazione nel terreno di provenienza del foraggio (tipico dei prati di montagna) e la presenza nella dieta di piante leguminose (più diffuse in ambienti montani) che utilizzano come fonte di azoto oltre ai nitrati del terreno anche l'azoto dell'aria isotopicamente più povero, forniscono un ulteriore elemento caratterizzante in quanto tendono ad abbassare il tenore in ^{15}N nei prodotti. Ciò è stato verificato in particolare nei prodotti lattiero-caseari.

Nelle catene trofiche acquatiche il $\delta^{15}\text{N}$ è molto significativo per valutare il livello trofico di un organismo acquatico. Pesci predatori che sono ai vertici della catena alimentare hanno un contenuto maggiore di $\delta^{15}\text{N}$ rispetto alle loro prede, ed ancora maggiore rispetto a zooplancton o fitoplancton. Si è stimato che per ogni passaggio nella catena trofica ci sia un arricchimento di $\delta^{15}\text{N}$ di

circa il 3-5 ‰ (Doucett *et al.*, 1996).

Anche il rapporto isotopico dell'ossigeno ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) nell'acqua contenuta in un alimento memorizza le caratteristiche isotopiche dell'acqua assunta dall'animale, le quali sono influenzate da fattori geografici quali altitudine, latitudine e distanza dal mare.

5 - CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Questa breve rassegna ha avuto lo scopo di dare alcune indicazioni sulle motivazioni e sulle tecniche disponibili per la valutazione delle caratteristiche qualitative e di autenticità dei prodotti di origine animale. Siamo convinti che qualificare le produzioni animali sarà il solo modo con cui il sistema zootecnico italiano, ma anche quello europeo dei 25, potrà competere nei mercati globalizzati, per la tipologia del nostro sistema di prodotti ed essendo tradizione radicata nel nostro paese anche nei consumatori quella del “prodotto tipico”. Per altro verso sarà in ogni caso impossibile competere sui costi di produzione e quindi sui conseguenti prezzi al consumo con aree economiche concorrenti, senza bisogno di andare sino in Cina.

BIBLIOGRAFIA

ANSFIELD M., REANEY S. D., JACKMAN R. (2000) - Production of a sensitive immunoassay for detection of ruminant and porcine proteins, heated to $> 130^{\circ}\text{C}$ at 2.7 bar, in compound animal feedstuffs. *Food and Agric. Immunol*, 12: 273-284.

ASENSIO L., GONZALEZ I., CESPEDAS A., HERNANDEZ P. E., GARCIA T., MARTIN, R. (2000) - Identification of Nile perch (*Lates niloticus*), grouper (*Epinephelus guaza*), and wreck fish (*Polyprion americanus*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of 12S rRNA gene fragment. *J. Food Prot.*, 63, 1248-1252.

AURSAND M., MABON F., MARTIN G.J. (2000) - Characterization of farmed and wild salmon (*Salmo salar*) by a combined use of compositional and isotopic analyses. *J. Amer. Oil Chemists Soc.*, 77 (6), 659-666.

BARLETT S. E., DAVIDSON W. S. (1992) - FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Bio Techniques*, 12, 408-411.

BELLAGAMBA F., MORETTI V. M., COMINCINO S., VALFRÈ F. (2001) - Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* 49 (8), 3775-3781.

BELLAGAMBA F., VALFRÈ F., PANSERI S., MORETTI V. M. (2003) - Polymerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. *J. Food Prot.* 66, 513-518.

BELLAGAMBA F., COMINCINI S., FERRETTI L., VALFRÈ F., MORETTI V.M. (2006) - Application of Quantitative Real-Time PCR in the detection of prion-protein gene Species-Specific DNA sequences in animal meals and feedstuffs. *J. Food Prot.*, 69, 891-896.

BRODMANN P. D., MOOR D. (2003) - Sensitive and semi-quantitative TaqMan real-time polymerase

chain reaction systems for the detection of beef (*Bos Taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. *Meat Sci.* 65, 599-607.

BUNTJER J. B., LEENSTRA J. A., HAAGSMA N. (1995) - *Rapid species identification by using satellite DNA probes*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 201, 577-582.

BUNTJER J. B., LAMINE A., HAAGSMA N., LENSTRA J. (1999) - A. Species identification by oligonucleotide hybridization: the influence of processing of meat products. *J. Sci. Food Agric.*, 79, (1) 53-57.

CARRERA E., GARCIA T., CESPEDAS A., GONZALEZ I., FERNANDEZ A., ASENSIO L.M., HERNANDEZ P.E., MARTIN R. (2000) - Differentiation of smoked Salmon salar, *Oncorhynchus mykiss* and *Brama* raii using the nuclear marker 5S rDNA. *Intern. J. Food Sci. Technol.*, 35, 401-408.

COMMISSION REGULATION (EC) No. 178/2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety

COMMISSION REGULATION (EC) No. 104/2000 of 17 December 1999 on the common organisation of the markets in fishery and aquaculture products

COMMISSION REGULATION (EC) No. 2065/2001 of 22 October 2001 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 104/2000 as regards informing consumers about fishery and aquaculture products

CUTRUFELLI M. E., MAGEAU R. P., SCHWAB B., JOHNSTON R. W. (1993) - Development of a multispecies identification field test by modified agar-gel immunodiffusion. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 76, 1022-1026.

DECRETO MINISTERIALE, 27/03/2002, Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. *Gazzetta Ufficiale* n. 84, del 10 aprile, 2002.

DOUCETT R.R., POWER G., BARTON D.R., DRIMMIE R.J., CUNJAK R.A. (1996) - Stable isotope analysis of nutrient pathways leading to Atlantic salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53, 2058-2066.

GAO H.W., ZANG D.B., PAN A.H., LIANG W.Q., LIANG C.Z. (2003) - Multiplex polymerase chain reaction method for detection of bovine materials in foodstuffs. *J. AOAC Int.* 86, 764-767.

JANSSEN F.W., HÄGELE G.H., VOORPOSTEL A.M.B., BAAIJ J. (1990) - A. Myoglobin analysis for determination of beef, pork, horse, sheep and kangaroo meat in blended cooked products. *J. Food Sci.*, 55, 1528-1530.

JANSSEN F.W., HÄGELE G.H., BUNTJER J.B., LENTRA J. (1998) - A. Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 115-120.

JOSE C., BUNTJER J.B., HAAGSMA N., BREUKELMAN H.J., BEINTEMA J.J., LENSTRA J. (1995) - A. Evolution and recombination of bovine DNA repeats. *J. Mol. Evol.*, 41, 227-283.

IRWIN D. M., KOCHER T. D., WILSON A. C. (1991) - Evolution of the Cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32, 128-144.

KOCHER T.D., THOMAS W.K., MEYER A., EDWARDS S.V., PÄABO S., VILLABLANCA F.X., WILSON A.C. (1989) - Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 86, 6196-6200.

KRČMÁŘ P., RENČOVÁ E. (2005) - Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. *J. Food Prot.*, 68, 1217-1221.

LAHIFF S., GLENNON M., O'BRIEN L., LYNJ J., SMITH T., MAHER M., SHILTON N. (2001) - Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat

and bone meal. *Mol. and Cel. Probes*, 15, 27-35.

LAHIFF S., GLENNON M., LING J., SMITH T., SHILTON N., MAHER M. (2002) - Real-Time polymerase chain reaction of bovine DNA in meat and bone meal samples. *J. Food Prot.*, 65, 1158-1165.

MARTIN R., WARDALE R.J., JONES S.J., HERNÁNDEZ P.E., PATTERSON R.L.S. (1991)- Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat mixtures of raw beef and pork. *Meat Sci.*, 30: 23-31.

MATSUNAGA T., CHIKUNI K., TANABE R., MUROYA S., SHIBATA K., YAMADA J., SHIMMURA Y. (1999) - A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.*, 51, 143-148.

MENDOZA-ROMERO L., VERKAAR E.L.C., SAVELKOUL P.H., CATSBURG A., AARTS H.J.M., BUNTJER J.B., LENSTRA J.A. (2004) - Real-Time detection of ruminant DNA. *J. Food Prot.*, 67, 550-554.

MEYER R., HOFELIN C., LUTHY J., CANDRIAN U. (1995) - Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J. AOAC Int.*, 78 (6), 1542-1551.

MORETTI V.M., TURCHINI G.M., BELLAGAMBA F., CAPRINO F. (2003) - Traceability issues in fishery and aquaculture products. *Vet. Res. Comm.*, 27 Suppl., 497-505.

QUINTERO J., SOTELO C.G., REHBEIN H., PRIDE S.E., MEDINA I., PÉREZ-MARTÍN R.I., REY-MÉNDEZ M., MACKIE I.M (1998) - Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-Restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1662-1669.

RAM J.L., RAM M.L., BAIDOUN F.F. (1996) - Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2460-2467.

REHBEIN H. (1990) - Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 191, 1-10.

REHBEIN H., KRESS G., SCHMIDT T. (1997) - Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. *J. Sci. Food Agric.*, 74, 35-41

REHBEIN H., SOTELO C.G., PEREZ-MARTIN R.I., CHAPELA-GARRIDO M.J., HOLD G.L., RUSSEL V.J., PRYDE S.E., SANTOS A.T., ROSA C., QUINTEIRO J., REY-MARTINEZ M. (2002) - Differentiation of raw or processed eel by PCR-Based techniques: restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) and single strand conformation polymorphism analysis (SSCP). *European Food Research and Technology*, 214, 171-177.

ROSSMANN A. (2001) - Determination of stable isotope ratios in food analysis. *Food Rev. Int.*, 17, 347-381.

RUSSELL V.J., HOLD G.L., PRYDE S.E., REHBEIN H., QUINTEIRO J., REY-MENDEZ M., SOTELO C.G., PEREZ-MARTIN R.I., SANTOS A.T., ROSA, C. (2000) - Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2184-2188.

SCHMIDT O., QUILTER J.M., BAHAR B., MOLONEY A.P., SCRIMGEOUR C.M., BEGLEY I.S., MONAHAN F.J. (2005) - Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable isotope ratio analysis. *Food Chem.*, 91 (3), 545-549.

SEBASTIO P., ZANELLI P., NERI T.M. (2001) - Identification of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) and gilt sardine (*Sardinella aurita*) by polymerase chain reaction, sequence of their

mitochondrial cytochrome b gene and restriction analysis of polymerase chain reaction products in semipreserves., *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1194–1199.

SEROT T., GANDEMER G., DEMAÏMAY M. (1998) - Lipid and fatty acid compositions of muscle from wild and farmed turbot. *Aquaculture Int.*, 6, 331–343.

SOTELO C.G., PINEIRO C., GALLARDO J.M., PEREZ-MARTIN R. (1993) - Fish species identification in seafood products. *Trends Food Sci. Technol.*, 4, 395–401.

TORSTENSEN B.E., LIE O., HAMRE K. (2001) - A factorial experimental design for investigation of effects of dietary lipid content and pro-and antioxidants on lipid composition in Atlantic salmon (*Salmo salar*) tissues and lipoproteins. *Aquaculture Nutr.*, 7(4), 265–276

TURCHINI G.M., MENTASTI T., FRØYLAND L., ORBAN E., CAPRINO F., MORETTI V.M., VALFRÈ, F. (2003) - Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissues chemical composition, mitochondrial fatty oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture*, 225, 251-267.

WOLF C., RENTSCH J., HÜBNER P. (1999) - PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1350-1355.

ZERIFI C., LANIE C., BENARD G. (1991). SDS-PAGE technique for species identification of cooked meat. *Fleischwirtschaft*, 71, 1060-1062.